

БИОТЕХНОЛОГИИ В ЖИВОТНОВОДСТВЕ И АКВАКУЛЬТУРЕ

УДК 577.21/:597.2/.5

СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ ТКАНЕЙ АФРИКАНСКОГО КЛАРИЕВОГО СОМА

Водчиц Н.В., зав. НИЛ КТР

Розумец А.В., 5 курс

Волкова Е.М., к.с./х.н., доцент

Ярмош В.В., аспирант

Полесский государственный университет

Введение. Выделение ДНК является первым и наиболее важным этапом молекулярно–генетического исследования. От качества его исполнения зависит успех всех последующих этапов исследования и результат. Неправильный выбор метода выделения ДНК или его неверное осуществление могут привести либо к получению загрязненной ДНК, непригодной для исследования, либо вообще к ее потере [1].

В общем случае, для выделения ДНК клетку необходимо разрушить тем или иным способом, а нуклеиновую кислоту очистить от других клеточных компонентов. Необходимо отделить ДНК от протеинов, входящих в состав нуклеопротеидных комплексов хроматина. При этом важно защитить её от действия нуклеаз и максимально сохранить целостность, поскольку длинные линейные молекулы ДНК при их изоляции из клетки неизбежно фрагментируются [4].

В настоящее время в аквакультуре Беларуси, начиная с 2012 года, выращивается африканский клариевый сом, мышечная ткань которого характеризуется высоким содержанием незаменимых аминокислот, Омега–3 жирных кислот, а также целым комплексом витаминов. Одной из важнейших характеристик данного вида рыбы является низкое содержание жира в ткани, что позволяет отнести его к диетическим продуктам [6].

Цель работы: поиск оптимального метода выделения ДНК с высокой степенью ее очистки от примесей из тканей африканского клариевого сома.

Методика и объекты исследования. Исследования были проведены на базе научно–исследовательской лаборатории прикладной и фундаментальной биотехнологии биотехнологического факультета учреждения образования “Полесский государственный университет” (далее БТФ ПолесГУ). В качестве исследуемых объектов использовали ткани (фрагменты усов и плавников) африканского клариевого сома (*Clarias gariepinus*), выращенного в искусственных условиях на базе аквариальной лаборатории БТФ ПолесГУ.

Для выделения ДНК использовали два разных метода: солевая [8] и фенол–хлороформная экстракция [7].

Длину фрагментов выделенной ДНК оценивали путём горизонтального электрофореза в 0,8 % агарозном геле, в трис–боратном буфере, при напряжении 70 V в течение 40 мин, по интенсивности флуоресценции в УФ–свете после связывания НК с бромистым этидием.

Точное измерение концентрации ДНК проводили по стандартной методике по объему 1,5 мкл полученного экстракта в 1–3 повторностях на спектрофотометре NanoDrop 1000, в диапазоне длин волн 220–350 нм.

Реакционная смесь для проведения ПЦР готовилась в объеме 25 мкл и включала стандартные компоненты. Амплификацию проводили на термоциклере Biometra [3].

Длину фрагментов амплифицированной ДНК оценивали в 2%-ном агарозном геле, в трис–боратном буфере, при напряжении 50 V в течение 180 мин. Визуализация результатов электрофореза проводилась в приборе гель–документирования Quantum ST4.

Результаты и их обсуждение. Успешное применение молекулярно–генетических методов анализа в значительной степени зависит от получения достаточного количества высокомолекулярной ДНК с ненарушенной структурой и высокой степенью очистки.

Для того чтобы получить высокоочищенные нуклеиновые кислоты необходимо использовать наиболее подходящие методы выделения ДНК.

У рыб наилучшим материалом для выделения ДНК, который можно взять прижизненно без причинения серьезных повреждений, являются фрагменты плавников [5]. В частности, у сомов – фрагменты усов, это объясняется явлением регенерации, т.е. восстановлением организмом утраченных частей тела на той или иной стадии жизненного цикла.

В работе провели сравнение двух методов выделения нуклеиновых кислот из биологического материала. В таблице приведены спектрофотометрические данные исследования чистоты и концентрации ДНК образцов.

Таблица – Спектрофотометрические характеристики образцов ДНК

Выделение №	Исследуемый объект	Солевая экстракция		Фенол–хлороформная экстракция	
		конц.	очистка	конц.	очистка
1	<i>Clarias gariepinus</i> (фр. пл.)	483,6	1,88	32,4	1,90
	<i>Clarias gariepinus</i> (фр.усов)	382,5	1,88	28,9	1,90
2	<i>Clarias gariepinus</i> (фр. пл.)	180,1	1,90	35,1	1,91
	<i>Clarias gariepinus</i> (фр. усов)	317,6	1,95	35,4	1,90

В основе метода солевой экстракции лежит агрегация нуклеиновых кислот в присутствии соли (NaCl) и спирта. Положительно заряженные ионы соли нейтрализуют отрицательный заряд на сахаро–фосфатном скелете ДНК, приводя к снижению растворимости последних в воде. В состав лизирующего буфера входит ЭДТА, хелатирующий агент, связывающий ионы металлов (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} и др.), который приводит к ингибированию металл–зависимых ферментов и нуклеаз, разрушающих ДНК. SDS (додецил–сульфат) – поверхностно–активное вещество, также входящее в состав лизирующего буфера, создает на белках сильный отрицательный заряд, вследствие чего происходит их денатурация и отделение от нуклеиновых кислот. Вызывает разрушение структуры мембран, вследствие разрушения её белковых составляющих.

После осаждения изоамиловым спиртом нуклеиновая кислота отделяется от раствора центрифугированием. Осадок, содержащий ДНК, отмывается 70% этиловым спиртом с последующим центрифугированием. Нужно отметить, что нуклеиновая кислота менее растворима в изопропанол, чем в этаноле, соответственно для ее осаждения требуются меньшая концентрации изопропанола [2].

Анализ ДНК, полученной методом солевой экстракции показал, что соотношение поглощения при 260/280 нм, в среднем, равно 1,90, что свидетельствует о том, что полученные образцы не содержат примесей. Наиболее высокая концентрация ДНК для сома составила: из фрагмента плавника – 483,6 нг/мкл; из фрагмента усов – 382,5 нг/мкл, а наименьшая соответственно: 180,1 нг/мкл и 317,6 нг/мкл.

Проанализировав данные по итогу выделения ДНК вторым методом (фенол–хлороформная экстракция), можно отметить, что применение смеси фенол : хлороформ : изоамиловый спирт (в пропорции 25:24:1) позволяет активно денатурировать белки, в том числе полностью инактивирует РНКазы. Из исследуемого объекта была получена ДНК высокой очистки 1.90–1,91, но при этом имела невысокие концентрации: для фрагментов плавника составила от 32,4 нг/мкл до 35,1 нг/мкл, для фрагментов усов – от 28,9 нг/мкл до 35,4 нг/мкл. Возможно фенол и хлороформ, действующие как депротенинизирующий агент, из–за высокой концентрации приводят к деградации ДНК.

Применение реагента фенола, высокотоксичного раздражающего вещества, представляет опасность для здоровья человека [9].

На электрофореграмме образцов ДНК, выделенных двумя протоколами видно, что нуклеиновая кислота светится в виде довольно компактной полосы, что свидетельствует о ее малой фрагментации.

После проведения ПЦР–реакций с ДНК–матрицей, выделенной методом солевой экстракции, на электрофореграмме с праймером UBC 845 визуализировалось от 4 до 7 четких фрагментов.

После проведения ПЦР–реакций с ДНК–матрицей, выделенной методом фенол–хлороформной экстракции, на электрофореграммах с праймером UBC 845, определялись достаточно размытые 1–2 маркера.

Выводы. По результатам исследования можно сделать вывод, что метод солевой экстракции является более эффективным. Применение данного метода позволяет добиться выделения высокомолекулярной ДНК высокой концентрации, не требует использования вредного для здоровья человека реагента фенола. Степень очистки довольно высокая, что позволяет широко использовать препарат ДНК при проведении ПЦР-анализа. Этот метод более быстр в исполнении по сравнению с фенол-хлороформным методом выделения ДНК.

Список использованных источников

1. Бадзюк, И.Л. Анализ современных методов извлечения ДНК из биологических объектов судебной экспертизы / И.Л. Бадзюк [и др.] // Иркутск: Восточно-Сибирский институт МВД РФ. – 2012. – № 1. – С. 81–89.
2. Ведерников, В.Е. Сравнительная характеристика способов экстракции нуклеиновых кислот / В.Е. Ведерников // Лаборатория. – 2012. – №4. – С.14–15.
3. Водчиц, Н.В. Применение ISSR-маркеров для генетической паспортизации и сертификации растений рода *Vaccinium* / Н.В. Водчиц // Весці НАНБ. Сер. Біял. Навук. – 2016. – № 3. – С. 115–120.
4. Практикум по молекулярной генетике. Учебно-методическое пособие / А.Р. Каюмов, О.А. Гимадудинов – Казань: Казань, КФУ, 2016. – 36 с.
5. Способ получения ДНК из яйцеклеток рыб / Единый депозитарий результатов интеллектуальной деятельности [Электронный ресурс]. – 2018. – Режим доступа: <https://edrid.ru/rid/218.016.0c3a.html>. – Дата доступа: 28.10.2018.
6. Ценность и польза клариевого сома / Agastia farm [Электронный ресурс]. – 2018. – Режим доступа: <https://agastiafarm.com/o-nac/cennost-i-polza-soma/>. – Дата доступа: 28.10.2018.
7. Extraction of DNA from Fish Fins / Virtual Amrita Laboratories Universalizing Education [Электронный ресурс] – 2011. – Режим доступа: <http://vlab.amrita.edu/?brch=77&cnt=2&sim=218&sub=3>. – Дата доступа: 28.10.2018.
8. Extraction of DNA from tissue. High salt method / The University of Liverpool [Электронный ресурс]. – 2001. – Режим доступа: <https://www.liverpool.ac.uk/~kempsj/IsolationofDNA.pdf>. – Дата доступа: 28.10.2018.
9. Phenol and its toxicity / Afilah Abd Gami [et al.] // Journal of environmental microbiology and toxicology. – 2013. Vol. 2, № 1. – P. 11–24.